

平成19年度科学研究費補助金実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号 3 2 6 9 2 2. 研究機関名 東京工科大学
3. 研究種目名 若手研究 (B) 4. 研究期間 平成18年度～平成19年度
5. 課題番号 1 8 7 6 0 5 9 9
6. 研究課題名 分割した転写因子の機能回復によるタンパク質相互作用検出法の開発

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
5 0 3 5 8 1 3 1	宮地, 寛登	バイオニクス学部	助教

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要(国立情報学研究所でデータベース化するため、600字～800字で記入。図、グラフ等は記載しないこと。)

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

タンパク質は、細胞内で相互作用して機能していることが知られている。タンパク質-タンパク質相互作用の解析は、細胞内においてタンパク質の機能を理解する上で極めて重要である。しかし、既存の解析法として用いられる酵母のTwo Hybrid Systemは、煩雑な操作を要し、検出するまでに長時間を要した。そこで、本研究では迅速かつ簡便なタンパク質相互作用解析法の開発を試みた。

本研究は、無細胞タンパク質合成技術を用いタンパク質を試験管内で発現し、発現したタンパク質間で相互作用が起きた時のみ蛍光強度が変化する機構を利用した解析系を確立することを目的とした。このため、転写因子 (RNA polymerase: RNAP) の立体構造に着目して転写活性が失活するよう酵素を2分割し、分割したRNAPにそれぞれリンカーを介して候補タンパク質を連結した構造を有する2種類の鋳型DNAを構築した。鋳型DNAにはそれぞれプロモーター配列が付加されており、無細胞タンパク質合成反応液中で2種類の融合タンパク質を同時に発現できるよう工夫してある。構築した鋳型DNAを無細胞タンパク質合成反応系に滴下した結果、発現した候補タンパク質間で相互作用が認められた場合のみRNAPの転写機能が回復し、このとき回復した転写機能により蛍光タンパク質を発現することで、蛍光測定によるタンパク質の相互作用解析ができることがわかった。既存のタンパク質相互作用検出とは異なり、本法はPCR (Polymerase Chain Reaction) 産物などからクローニング、タンパク質大量発現や固定化する過程を経ることなくタンパク質相互作用の解析ができる。相互作用解析したいタンパク質のcDNAから相互作用解析に必要な時間は3時間程度であった。

※ 成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した調書(A4判縦長横書1枚)を添付すること。

10. キーワード

- | | | |
|---------------|------------|---------|
| (1) バイオテクノロジー | (2) 生体機能利用 | (3) |
| (4) | (5) | (6) |
| (7) | (8) | (裏面に続く) |

11. 研究発表（平成19年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（ 0 ）件

著者名	論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁

著者名	論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁

著者名	論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁

〔学会発表〕 計（ 1 ）件

発表者名	発表標題		
○宮地寛登、軽部征夫	分割した転写酵素の機能回復機構によるタンパク質相互作用解析法		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第30回日本分子生物学会	2007年12月14日	パシフィコ横浜	

〔図書〕 計（ 0 ）件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

12. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計（ 0 ）件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計（ 0 ）件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別

13. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

--